

DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



WIPO PCT

A 9161
03/00
EDV-L

**Verfahren zur Herstellung von enantiomerenangereicherten
 α -Hydroxycarbonsäuren bzw. -amide**

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von enantiomerenangereicherten α -

5 Hydroxycarbonsäuren bzw. -amiden. Insbesondere bezieht sich die Erfindung auf ein Verfahren, bei dem in einem ersten Schritt aus Cyaniddonoren, einem Aldehyd und einem Keton in Gegenwart von einer Oxynitrilase ein Cyanhydrin geniert wird, welches in einem zweiten Schritt von einer Nitrilase
10 bzw. Nitrilhydratase zur entsprechenden Säure weiter umgesetzt wird. Weiterhin bezieht sich die Erfindung auf ein derart arbeitendes Reaktionssystem sowie auf neue Organismen, welche im Stande sind, die eben angesprochene Zweistufenreaktion durchzuführen.

15 Enantiomerenangereicherte α -Hydroxycarbonsäuren und deren Amide sind wichtige Syntheseprodukte im Bereich der organischen Chemie. Sowohl als Vorläufermoleküle für Ligandensynthesen, als chirale Racemattrennungsgenzien oder als Zwischenprodukte zur Herstellung von bioaktiven
20 Wirkstoffen können diese Verbindungen erfolgreich eingesetzt werden.

Die klassische Synthese dieser Art von Verbindungen erfolgt im Allgemeinen durch eine Cyanhydrinreaktion mit anschließender saurer Hydrolyse und Racematspaltung über
25 diastereomere Salzbildung (Bayer-Walter, Lehrbuch der Organischen Chemie, S. Hirzel Verlag Stuttgart, 22. Auflage, S. 555). Die Hydrolyse kann wahlweise auf der Stufe der Amide gestoppt oder komplett zur Säure durchgeführt werden.

30 Die Herstellung optisch aktiver α -Hydroxycarbonäuren wurde *bis dato* auch dadurch erreicht, dass entweder die Cyanhydrinbildung in Form einer asymmetrischen Addition eines Cyaniddonors an einen Aldehyd in Gegenwart eines chiralen Katalysators, z.B. eines Enzyms wie der

Oxynitrilase, durchgeführt wird, gefolgt von einer „klassischen“ Hydrolyse, oder alternativ durch Herstellung eines racemischen Cyanhydrins, gefolgt von einer enantioselektiven Hydrolyse in Gegenwart einer Nitrilase.

- 5 Die zuerst genannte Variante der Ausbildung chiraler Cyanhydrine durch Umsetzung von Blausäure mit einem Aldehyd in Gegenwart von einer Oxynitrilase als Enzym wurde beispielsweise von Effenberger et al. beschrieben (F. Effenberger et al., Angew. Chem. 1987, 99, 491-492). Die
- 10 hier gezeigte Reaktion findet im 2-Phasensystem bestehend aus einer organischen, mit Wasser nicht mischbaren Lösemittel-Phase, vorzugsweise Essigsäureethylester, sowie einer wässrigen Phase statt. Die Umsetzung erfolgt dabei zumindest für einen Teil der Aldehyde mit ausgezeichneten
- 15 Ausbeuten und optischen Reinheiten. In Bezug auf die optische Reinheit der Cyanhydrine wurde die enzymatische Addition von Cyaniddonoren an Aldehyde in Gegenwart der Enzyme (R)-Oxynitrilase bzw. (S)-Oxynitrilase bereits eingehend untersucht. Alternativ kann die Reaktion auch in
- 20 rein-wässrigen Systemen durchgeführt werden, wobei hier vorzugsweise bei niedrigen pH-Werten gearbeitet wird (U. Niedermeyer, M. R. Kula, Angew. Chem. 1990, 102, 423.) Auch immobilisierte Enzyme wurde für diese Art der Reaktion schon eingesetzt (DE-PS 13 00 111). Es hat auch den Versuch
- 25 gegeben, die enzymatische Reaktion in einem organischen Medium auszuführen (P. Methe et al., US-PS 5,122,462; J. Am. Chem. Soc., 1999, 120, 8587; US 5,177,242), Weitere Methoden der Umsetzung sind zu finden in: US-PS 5,122,462; Biotechnol. Prog. 1999, 15, 98 - 104; J. Am. Chem. Soc.,
- 30 1999, 120, 8587). Ergänzend wurden ebenfalls Methoden zur Immobilisierung der (S)-Oxynitrilasen entwickelt, die von der Funktionsweise denen der (R)-Oxynitrilasen vergleichbar sind. So wird von Effenberger et al. die Immobilisierung der (S)-Oxynitrilasen durch die Anbindung an einen
- 35 Nitrocelluloseträger erreicht (F. Effenberger et al., Angew. Chem. 1996, 108, 493-494). Über eine Immobilisierung durch Anbindung des Enzyms an eine poröse Membran berichten

Andruski et al. (US 5,177,242). Trotz dieser z. T. durchaus
erfolgversprechenden Ansätze mit immobilisierten Enzymen
sind neuerdings wieder vermehrt Veröffentlichungen
erschienen, die von Arbeiten mit nicht-immobilisierten
5 Enzymen berichten (bspw. EP-A 0 927 766 und US 5,714,356).

10 Trotz der bemerkenswerten Enantioselektivitäten, die bei
der biokatalytischen asymmetrischen Cyanhydrinsynthese
erzielt werden, besteht ein erheblicher Nachteil in dem
benötigten hydrolytischen Folgeschritt, der „klassisch“ via
saurer Hydrolyse mit starken Mineralsäuren durchgeführt
wird. Dies resultiert in hohen Salzabfallmengen, was sowohl
ökonomisch als auch ökologisch ein Problem darstellt. Zudem
sind die benötigten Hydrolysebedingungen ungünstig, da
sowohl lange Reaktionszeiten von mehreren Stunden als auch
15 hohe Temperaturen erforderlich sind. Unter den
Hydrolysebedingungen besteht eine hohe Gefahr der
Racemisierung.

Die alternative Variante des Zugangs zu den gewünschten
optisch aktiven α -Hydroxycarbonsäuren bzw. -amiden
20 beinhaltet - wie obig erwähnt - eine enzymatische Hydrolyse
eines racemischen Cyanhydrins.

Diese Transformation kann durch Nitrilasen katalysiert
werden. Nitrilasen sind Enzyme, die organische
Cyanoverbindungen in die entsprechenden Carbonsäuren
25 umwandeln können. Sie gehören der Klasse E.C.3.5.5.1 an und
werden kommerziell u.a. zur Synthese von (+)-Ibuprofen
eingesetzt. Ein Abriss des bekannten Standes der Technik
findet sich in Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, VCH,
1995, S. 367ff. Es wurde auch der Einsatz einer Nitrilase
30 zur Herstellung von enantiomer angereicherter Mandelsäure
von Yamamoto et al. beschrieben (Appl. Environ. Microbiol.
1991, 57, 3028-32).

Nitrilhydratasen gehören zur Gruppe E.C. 4.2.1.84. Sie
bestehen aus α , β -Untereinheiten und können als multimer
35 Polypeptide mit bis zu 20 verschiedenen Einheiten

existieren (Bunch A. W. (1998), Nitriles, in: Biotechnology, Volume 8a, Biotransformations I, Chapter 6, Eds.: Rehm H.J., Reed G., Wiley-VCH, p. 277-324; Kobayashi, M.; Shimizu, S. (1998) Metalloenzyme nitrile hydratase: structure, regulation, and application to biotechnology. Nature Biotechnology 16(8), 733-736). Viele Dokumente zeigen die enzymatische Umwandlung von Nitrilen in Amide (EP0362829 (Nitto); DE4480132 (Institute Gniigenetika); WO9832872 (Novus); US5200331; DE3922137; EP0445646; Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, VCH, 1995, S. 365ff).

Allerdings weisen auch diese alternativen Verfahren eine Reihe von Nachteilen auf. Die Enantioselektivitäten sind oftmals nicht >99% ee, was aber gerade für pharmazeutische Bedürfnisse eine Voraussetzung darstellt. Zudem besteht die Gefahr, dass Nitrilasen und Nitrilhydratasen empfindlich gegenüber der Anwesenheit von Cyaniddonoren sein könnten, so dass von sehr reinen Cyanhydrinen ausgegangen werden muss.

Ein genereller Nachteil **aller** bisheriger Methoden ist die Zweistufigkeit des Verfahrens, was eine deutliche Reduzierung der Raum-Zeit-Ausbeute und Effizienz des Gesamtprozesses zur Folge hat. Diese Zweistufigkeit, einschließlich zweier Aufarbeitungen war notwendig, da man von einer Inkompatibilität der Reaktionsbedingungen von enzymatischer Cyanhydrinsynthese und enzymatischer Nitrilverseifung ausgehen musste.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Angabe eines weiteren Verfahrens zur Herstellung von enantiomerenangereicherten α -Hydroxycarbonsäuren/amiden. Dieses Verfahren sollte im technischen Maßstab unter ökonomischen wie ökologischen Gesichtspunkten vorteilhaft sein. Insbesondere sollte es den Verfahren des Standes der Technik im Hinblick auf Stoffeinsatzkosten, Robustheit und Effizienz (z.B. Raum-Zeit-Ausbeute) überlegen sein und die oben genannten Nachteile des bisherigen Stands der Technik

vermeiden. Insbesondere sollte die bisher bei allen Prozesses auftretende Zweistufigkeit des Verfahrens vermieden werden.

Diese Aufgaben werden anspruchsgemäß gelöst.

- 5 Dadurch, dass man in einem Verfahren zur Herstellung von enantiomerenangericherten α -Hydroxycarbonsäuren oder enantiomerenangereicherten α -Hydroxycarbonsäureamiden von einem Cyaniddonor, einem Aldehyd oder Keton ausgeht und diese in Gegenwart einer Oxynitrilase und einer Nitrilase oder einer Nitrilhydratase zur Reaktion bringt, kommt man
10 äußerst überraschend und erfindungsgemäß besonders vorteilhaft zur Lösung der gestellten Aufgabe. Enantiomerenangereicherte α -Hydroxycarbonsäuren/amide können mit dem erfindungsgemäßen System in sehr guten
15 Ausbeuten und besonders hohen Enantiomerenanreicherungen erhalten werden. Es war zum Zeitpunkt der Erfindung dem Fachmann mitnichten geläufig, dass die beschriebene Enzymkaskade in dem vorhandenen Reaktionsmilieu derart effektiv eingesetzt werden kann. Als besonders überraschend
20 kann dabei angesehen werden, dass gerade die erheblichen Mengen an vorhandenem Cyanid nicht zu den aus dem bisherigen Stand der Technik zu erwartenden Inhibierungseffekten, insbesondere gegenüber der Nitrilase bzw. Nitrilhydratase, führten.
- 25 Demnach betrifft eine Ausgestaltung der gegenständlichen Erfindung die Tatsache, dass man in einem Verfahren zur Herstellung von enantiomerenangereicherten α -Hydroxycarbonsäuren einen Cyaniddonor mit einem Aldehyd oder Keton in Gegenwart einer Oxynitrilase und einer
30 Nitrilase umsetzt.

Desgleichen können enantiomerenangereicherte α -Hydroxycarbonsäureamide ausgehend von einem Cyaniddonor, einem Aldehyd oder Keton in Gegenwart einer Oxynitrilase und einer Nitrilhydratase gewonnen werden.

Als Oxynitrilasen können alle dem Fachmann für diesen Zweck ins Auge springenden Enzyme eingesetzt werden. Eine Auswahl kann aus Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Eds.: K. Drauz, H. Waldmann, VCH, 1995, S. 580f entnommen werden.

- 5 Vorteilhaft ist der Einsatz von solchen, die unter den gegebenen Reaktionsbedingungen eine lange Standzeit und ausreichende Umsetzung bewerkstelligen. Dies sind insbesondere solche Oxinitrilasen, die aus einem Organismus ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *Sorghum bicolor*,
10 *Hevea brasiliensis* und *Mannihot esculenta* stammen. Zur Herstellung von (R)-Cyanhydrinen werden Oxynitrilasen aus den genannten Mikroorganismen bzw. aus Mandelkernen eingesetzt. Es ist dabei zu beachten, dass vorzugsweise zur Herstellung von (S)- α -Hydroxycarbonsäuren Oxynitrilasen
15 der (S)-Reihe herangezogen werden und umgekehrt, um eine ausreichende Umsetzung zum Endmolekül gewährleisten zu können.

- Als Nitrilasen können prinzipiell ebenfalls alle zur Verfügung stehenden herangezogen werden, sofern sie unter
20 den gegebenen Milieubedingungen eine ausreichende Stabilität und Umsetzung gewährleisten. Eine Auswahl kann aus Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Eds.: K. Drauz, H. Waldmann, VCH, 1995, S. 365f entnommen werden. Es sind dies u.a. solche, welche aus Organismen stammen, die
25 ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus *Rhodococcus*-Stämmen bzw. aus *Alcaligenes faecalis*. Im Zusammenspiel mit der reversibel agierenden Oxynitrilase bewirkt die Nitrilase eine irreversible Umsetzung der Nitrilfunktion zur Carbonsäure. Hierdurch wird erreicht, dass das
30 gebildete Cyanhydrin dem Gleichgewicht entzogen wird, was zu einer vollständigen Umsetzung des Aldehyds oder Ketons oder des Cyaniddonors führt, je nachdem, welche Komponente im Überschuss eingesetzt wird. Die Nitrilase sollte möglichst hoch enantioselektiv reagieren, um die gewünschte
35 Enantiomerenreinheit im Endprodukt sicher zu stellen. In diesem Fall ist der Anspruch an die Enantioselektiv der

eingesetzten Oxynitrilase nicht so hoch. Sofern eine Nitrilase eingesetzt wird, deren Enantioselektivität nicht ausreichend ist, sollte auf die Gegenwart einer entsprechend differenzierenden Oxynitrilase allerdings Wert
5 gelegt werden.

Als Nitrilhydratasen können im Prinzip ebenfalls alle zur Verfügung stehenden herangezogen werden, sofern sie unter den gegebenen Milieubedingungen eine ausreichende Stabilität und Umsetzung gewährleisten. Eine Auswahl kann
10 aus Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Eds.: K. Drauz, H. Waldmann, VCH, 1995, S. 365f entnommen werden. Es sind dies u.a. solche, welche aus Organismen stammen, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Rhodococcus-Stämmen, insbesondere R. spec., R. rhodochrous und R.
15 erythropolis. In diesem Zusammenhang wird auf die EP03001715 und die dort genannten und bevorzugt verwendeten Nitrilhydratasen verwiesen. Im Zusammenspiel mit der reversibel agierenden Oxynitrilase bewirkt die Nitrilhydratasen eine irreversible Umsetzung der
20 Nitrilfunktion zur Carbonsäure. Hierdurch wird erreicht, dass das gebildete Cyanhydrin dem Gleichgewicht entzogen wird, was zu einer vollständigen Umsetzung des Aldehyds oder Ketons oder des Cyaniddonors führt, je nachdem, welche Komponente im Überschuss eingesetzt wird. Die
25 Nitrilhydratase sollte möglichst hoch enantioselektiv reagieren, um die gewünschte Enantiomerenreinheit im Endprodukt sicher zu stellen. In diesem Fall ist der Anspruch an die Enantioselektivität der eingesetzten Oxynitrilase nicht so hoch. Sofern eine Nitrilhydratase
30 eingesetzt wird, deren Enantioselektivität nicht ausreichend ist, sollte auf die Gegenwart einer entsprechend differenzierenden Oxynitrilase allerdings Wert gelegt werden. Es sei angemerkt, dass man durch eine weitere enzymatische oder klassische Hydrolyse die mit
35 diesem System generierten enantiomerenangereicherten α -Hydroxycarbonsäureamide in die entsprechenden Säuren

überführen kann. Sollte dabei auf der Stufe der Amide eine nicht ausreichende Enantiomerenreinheit resultieren, kann diese durch Einsatz einer weiteren enantioselektiv arbeitenden Amidase verbessert werden. Geeignete Amidasen
5 finden sich in Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, VCH, 1995, S. 367ff.

Die erwähnten Enzyme können sowohl als Wild-Typ als auch als weiterentwickelte und durch Mutagenese verbesserte Mutanten in dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Anwendung
10 kommen. Mutageneseverfahren, die eine verbesserte Stabilität und/oder Selektivität der Enzyme hervorbringen können, sind dem Fachmann bekannt. Insbesondere sind dies die Sättigungsmutagenese, die Random-Mutagenesis, Shuffling-Methoden sowie Site-Directed-Mutagenesis (Eigen M. and
15 Gardinger W. (1984) Evolutionary molecular engineering based on RNA replication. Pure & Appl. Chem. 56(8), 967-978; Chen & Arnold (1991) Enzyme engineering for nonaqueous solvents: random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media. Bio/Technology 9,
20 1073-1077; Horwitz, M. And L. Loeb (1986) "Promoters Selected From Random DNA-Sequences" Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 83(19): 7405-7409; Dube, D. And L. Loeb (1989) "Mutants Generated By The Insertion Of Random
25 Oligonucleotides Into The Active-Site Of The Beta-Lactamase Gene" Biochemistry 28(14): 5703-5707; Stemmer PC (1994). Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. Nature. 370; 389-391 und Stemmer PC (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination
30 for molecular evolution. Proc Natl Acad Sci USA. 91; 10747-10751). Unter verbesserter Selektivität wird erfindungsgemäß entweder eine Erhöhung der Enantioselektivität und/oder eine Verringerung der Substratselektivität verstanden.

Für die Anwendung kann das jeweils betrachtete Enzym in freier Form, als homogen aufgereinigte Verbindung verwendet werden. Weiterhin kann das Enzym auch als Bestandteil eines intakten Gastorganismus eingesetzt werden oder in

- 5 Verbindung mit der aufgeschlossenen und beliebig hoch aufgereinigten Zellmasse des Wirtsorganismus. Möglich ist ebenfalls die Verwendung der Enzyme in immobilisierter Form (Bhavender P. Sharma, Lorraine F. Bailey and Ralph A. Messing, "Immobilisierte Biomaterialien - Techniken und
10 Anwendungen", Angew. Chem. 1982, 94, 836-852).
Vorteilhafterweise erfolgt die Immobilisierung durch Lyophilisation (Dordick et al. J. Am. Chem. Soc. 194, 116, 5009-5010; Okahata et al. Tetrahedron Lett. 1997, 38, 1971-1974; Adlercreutz et al. Biocatalysis 1992, 6, 291-305).
15 Ganz besonders bevorzugt ist die Lyophilisation in Gegenwart von oberflächenaktiven Substanzen, wie Aerosol OT oder Polyvinylpyrrolidon oder Polyethylenglycol (PEG) oder Brij 52 (Diethylenglycol-mono-cetylether) (Goto et al. Biotechnol. Techniques 1997, 11, 375-378). Die Verwendung
20 als CLECs ist ebenfalls denkbar (St Clair et al. Angew Chem Int Ed Engl 2000 Jan, 39(2), 380-383).

Prinzipiell kann das gegenständliche Verfahren in rein wässriger Lösung durchgeführt werden. Es ist jedoch auch möglich, der wässrigen Lösung beliebige Teile eines
5 wasserlöslichen organischen Lösungsmittels zuzusetzen, um z.B. die Reaktion im Hinblick auf schlecht wasserlösliche Substrate zu optimieren. Als solche Lösungsmittel kommen insbesondere Ethylenglykol, DME oder Glycerin in Betracht. Weiterhin können aber auch Mehrphasen-, insbesondere
30 Zweiphasensysteme aufweisend eine wässrige Phase als Lösungsmittelgemisch für das erfindungsgemäße Verfahren dienen. Hier hat sich der Einsatz bestimmter nicht wasserlöslicher Lösungsmittel schon bewährt (DE10233107). Die dort diesbezüglich gemachten Aussagen gelten hier
35 entsprechend.

Im Prinzip ist der Fachmann bei der Wahl der während der Reaktion vorhandenen Temperatur frei. Er orientiert sich vorzugsweise an dem Erhalt einer möglichst hohen Ausbeute an Produkt in möglichst hoher Reinheit in möglichst kurzer
5 Zeit. Zudem sollten die eingesetzten Enzyme unter den eingesetzten Temperaturen hinreichend stabil sein und die Reaktion sollte mit einer möglichst hohen Enantioselektivität verlaufen. Im Hinblick auf den Einsatz von Enzymen aus thermophilen Organismen können durchaus
10 Temperaturen von 80-100°C die obere Grenze des Temperaturbereichs bei der Reaktion darstellen. Als untere Grenze in wässrigen Systemen sind -15°C sicher sinnvoll. Vorteilhaft ist ein Temperaturintervall zwischen 10 und 60, besonders bevorzugt zwischen 20 und 40°C einzustellen.

15 Der pH-Wert während der Reaktion wird vom Fachmann anhand der Enzymstabilitäten und Umsatzraten ermittelt und entsprechend für das erfindungsgemäße Verfahren eingestellt. Im allgemeinen wird der für Enzyme bevorzugte Bereich von pH 3 bis 11 gewählt. Vorzugsweise kann ein pH-
20 Bereich von 3,0 bis 10,0, insbesondere 6,0 bis 9,0 vorliegen.

In einer weiteren Ausgestaltung bezieht sich die Erfindung auf ein enzymatisches Reaktionssystem aufweisend eine Oxynitrilase, eine Nitrilase oder Nitrilhydratase, Wasser,
25 einen Cyaniddonor und einen Aldehyd oder ein Keton. Optional kann zudem die Gegenwart eines organischen Lösungsmittels möglich sein, wie oben ausführlich beschrieben wurde.

Prinzipiell gelten für dieses Reaktionssystem die gleichen
30 Vorteile und bevorzugten Ausführungsformen, wie sie in Bezug auf das erfindungsgemäße Verfahren schon genannt wurden.

Vorteilhaft eingesetzt wird das Reaktionssystem beispielsweise in einem Rührkessel, einer

35 Rührkesselkaskaden oder in Membranreaktoren, die sowohl im

batch-Betrieb als auch kontinuierlich betrieben werden können.

Im Rahmen der Erfindung wird unter Membranreaktor jedwedes Reaktionsgefäß verstanden, bei dem der Katalysator in einem Reaktor eingeschlossen wird, während niedermolekulare Stoffe dem Reaktor zugeführt werden oder ihn verlassen können. Dabei kann die Membran direkt in den Reaktionsraum integriert werden oder außerhalb in einem separaten Filtrationsmodul eingebaut sein, bei der die Reaktionslösung kontinuierlich oder intermittierend durch das Filtrationsmodul strömt und das Retentat in den Reaktor zurückgeführt wird. Geeignete Ausführungsformen sind u.a. in der WO98/22415 und in Wandrey et al. in Jahrbuch 1998, Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen, VDI S. 151ff.; Wandrey et al. in Applied Homogeneous Catalysis with Organometallic Compounds, Vol. 2, VCH 1996, S.832 ff.; Kragl et al., Angew. Chem. 1996, 6, 684f. beschrieben. Die in dieser Apparatur neben der batch und semikontinuierlichen Fahrweise mögliche kontinuierliche Fahrweise kann dabei wie gewünscht im Cross-Flow-Filtrationsmodus (Fig. 1) oder als Dead-End-Filtration (Fig. 2) durchgeführt werden. Beide Verfahrensvarianten sind prinzipiell im Stand der Technik beschrieben (Engineering Processes for Bioseparations, Ed.: L.R. Weatherley, Heinemann, 1994, 135-165; Wandrey et al., Tetrahedron Asymmetry 1999, 10, 923-928).

Einen weiteren Aspekt der Erfindung bildet ein Ganzzellkatalysator aufweisend ein kloniertes Gen für eine Oxynitrilase und eine Nitrilase oder eine Nitrilhydratase. Bevorzugt sollte der erfindungsgemäße Ganzzellkatalysator als Oxynitrilase bzw. Nitrilase oder Nitrilhydratase einen der oben angesprochenen Vertreter aufweisen. Vorzugsweise enthält der Ganzzellkatalysator im Falle des Vorliegens einer Nitrilhydratase ebenfalls ein kloniertes Gen für eine Amidase aufweist.

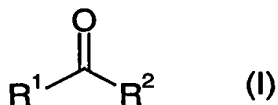
Die Herstellung eines solchen Organismus ist dem Fachmann

geläufig (PCT/EP00/08473; PCT/US00/08159; Sambrook et al. 1989, Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Balbas P & Bolivar F. 1990; Design and construction of expression plasmid vectors in E.coli, Methods Enzymology 185, 14-37; Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses. R.L. Rodriguez & D.T. Denhardt, Eds: 205-225). Die dort genannten Verfahrenswesen können hier äquivalent umgesetzt werden. Bezüglich der allgemeinen Vorgehensweise (PCR, Klonierung, Expression etc.) sei auch auf folgende Literatur und das dort zitierte verwiesen: Universal GenomeWalker™ Kit User Manual, Clontech, 3/2000 und dort zitierte Literatur; Triglia T.; Peterson, M. G. und Kemp, D.J. (1988), A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences, Nucleic Acids Res. 16, 8186; Sambrook, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York; Rodriguez, R.L. und Denhardt, D. T (eds) (1988), Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses, Butterworth, Stoneham.

Der Vorteil eines solchen Organismus ist die gleichzeitige Expression beider Enzymsysteme, womit nur noch ein re-Organismus für die Reaktion angezogen werden muss. Um die Expression der Enzyme im Hinblick auf ihre Umsetzungsgeschwindigkeiten abzustimmen, können die entsprechend codierenden Nukleinsäurefragmente auf unterschiedlichen Plasmiden mit unterschiedlichen Kopiezahlen untergebracht werden und/oder unterschiedlich starke Promotoren für eine unterschiedlich starke Expression der Gene verwendet werden. Bei derart abgestimmten Enzymsystemen tritt vorteilhafterweise eine Akkumulation einer ggf. inhibierend wirkenden Zwischenverbindung nicht auf und die betrachtete Reaktion kann in einer optimalen Gesamtgeschwindigkeit ablaufen. Dies ist dem Fachmann jedoch hinlänglich bekannt (PCT/EP00/08473; Gellissen et al., Appl. Microbiol.

Biotechnol. 1996, 46, 46-54). Als Mikroorganismen können im Prinzip alle dem Fachmann für diesen Zweck in Frage kommenden Organismen wie z.B. Hefen wie *Hansenula polymorpha*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*,
 5 Prokaryonten, wie *E. coli*, *Bacillus subtilis* oder Eukaryonten, wie Säugerzellen, Insektenzellen herangezogen werden. Vorzugsweise sind *E. coli*-Stämme für diesen Zweck zu benutzen. Ganz besonders bevorzugt sind: *E. coli* XL1 Blue, NM 522, JM101, JM109, JM105, RR1, DH5 α , TOP 10⁻ oder
 10 HB101. Äußerst bevorzugt kann als Organismus der in der DE10155928 genannte herangezogen werden.

Als Aldehyde oder Ketone können solche mit aliphatischen oder aromatischen/heteroaromatischen Resten herangezogen werden. Diese können beliebig verzweigt und/oder
 15 substituiert sein, sofern diese Reste sich gegenüber der eigentlichen Umsetzung als inert erweisen. Vorteilhafterweise werden Verbindungen der allgemeinen Formel (I) in die Reaktion eingesetzt.



20 worin

R^1 bedeuten kann (C₁-C₈)-Alkyl, (C₂-C₈)-Alkenyl, (C₂-C₈)-Alkinyl, (C₁-C₈)-Alkoxyalkyl (C₃-C₈)-Cycloalkyl, (C₆-C₁₈)-Aryl, (C₇-C₁₉)-Aralkyl, (C₃-C₁₈)-Heteroaryl, (C₄-C₁₉)-Heteroaralkyl, ((C₁-C₈)-Alkyl)₁₋₃-(C₃-C₈)-Cycloalkyl, ((C₁-C₈)-Alkyl)₁₋₃-(C₆-C₁₈)-Aryl, ((C₁-C₈)-Alkyl)₁₋₃-(C₃-C₁₈)-Heteroaryl und
 25 R^2 bedeuten kann H, R^1 .

Als Cyaniddonoren kommen alle dem Fachmann unter den
 30 gegebenen Umständen zur Verfügung stehenden Verbindungen in Frage. Insbesondere werden solche eingesetzt, die möglichst kostengünstig zu erhalten sind, wobei jedoch auf eine

möglichst gute Umsetzung dieser Verbindungen in der erfindungsgemäßen Reaktion wert zu legen ist. Cyaniddonoren sind per Definition solche Verbindungen, die es gestatten unter den gegebenen Reaktionsbedingungen CN^- -Ionen frei zu setzen. Insbesondere sind dies solche ausgewählt aus der Gruppe enthaltend Blausäure, Metallcyanide wie Alkalicyanide, Trimethylsilylcyanid.

Im Allgemeinen geht man bei der erfindungsgemäßen Reaktion so vor, dass man die Enzyme als solche (Wild-Typ, rekombinant hergestellt), als Biomasse oder im intakten Gastorganismus (z.B. Ganzzellkatalysator) mit dem Aldehyd oder Keton in einer wässrigen Reaktionsmatrix vorlegt und anschließend den Cyaniddonor, wie z.B. ein Alkalicyanid (Natriumcyanid), zufügt. Unter den entsprechenden Reaktionsbedingungen bilden sich alsbald als Intermediat das entsprechende Cyanhydrin und daraus die enantiomerenangereicherte α -Hydroxycarbonsäure bzw. das -amid. Diese können nach dem Fachmann bekannten Verfahren aus der Reaktionsmischung isoliert werden. Vorzugsweise geschieht dies so, dass man die höhermolekularen Bestandteile durch Filtration entfernt und die Säure bzw. das Amid entweder sofort aus der Mischung durch Kristallisation isoliert oder bei einer lipophilen Säure bzw. Amid einen Extraktionsschritt in ein organisches Medium vor die Isolierung schaltet. Eine Aufarbeitung der Säure mittels Ionenaustauschchromatographie ist ebenfalls möglich.

Dergestalt lässt sich z.B. Benzaldehyd mit Natriumcyanid in hohen Ausbeuten von > 80%, bevorzugt > 85%, noch mehr bevorzugt > 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, weiter bevorzugt > 95%, 96%, 97% und Enantiomerenanreicherungen von > 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, weiter bevorzugt > 95%, 96%, 97% und äußerst bevorzugt > 98%, 99% in die entsprechende Mandelsäure umwandeln.

Zur Herstellung des erfindungsgemäßen Ganzzellkatalysators bedient sich der Fachmann den zuvor beschriebenen Methoden des Standes der Technik. Im einzelnen sind in einem solchen Ganzzellkatalysator enthalten eine

- 5 Nitrilase/Nitrilhydratase sowie eine Oxynitrilase. Die Sequenzen der relevanten Gene können aus öffentlich zugänglichen Gendatenbanken entnommen werden, z.B. aus der Gendatenbank NCBI (Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankOverview.html>).
- 10 Besonders bevorzugt sind dabei Enzyme, insb., Nitrilasen/Nitrilhydratasen mit einer hohen Cyanidresistenz. Man geht dabei vorzugsweise so vor, dass man die entsprechenden Sequenzen gemeinsam mit den entsprechenden notwendigen Gensequenzen wie Promotoren etc. entweder in
- 15 ein Plasmid oder auf mehrer Plasmide ligiert. Danach transformiert man diese in den ausgewählten Organismus, vervielfältigt diesen und setzt aktive Klone dann intakt oder als zerstoßene Biomasse in die Reaktion ein. Es war zum Zeitpunkt der Erfindung mitnichten naheliegend, dass
- 20 dergestalt eine Umsetzung wie beschreiben mit so guten Ergebnissen möglich ist.

Als (C₁-C₈)-Alkyl sind anzusehen Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, Isobutyl, sec-Butyl, tert-Butyl, Pentyl, Hexyl, Heptyl oder Octyl samt aller

25 Bindungsisomeren. Diese können einfach oder mehrfach mit (C₁-C₈)-Alkoxy, (C₁-C₈)-Haloalkyl, OH, Halogen, NH₂, NO₂, SH, S-(C₁-C₈)-Alkyl substituiert sein.

Als (C₂-C₈)-Alkenyl ist mit Ausnahme von Methyl ein wie oben dargestellter (C₁-C₈)-Alkyl-Rest zu verstehen, der

30 mindestens eine Doppelbindung aufweist.

Unter (C₂-C₈)-Alkinyl ist mit Ausnahme von Methyl ein wie oben dargestellter (C₁-C₈)-Alkyl-Rest zu verstehen, der mindestens eine Dreifachbindung aufweist.

Unter (C₃-C₈)-Cycloalkyl versteht man Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl bzw. Cycloheptylreste etc. Diese können mit einem oder mehreren Halogenen und/oder N-, O-, P-, S-atomhaltige Reste substituiert sein und/oder N-, O-, P-, S-atomhaltige Reste im Ring aufweisen, wie z. B. 1-, 2-, 3-, 4-Piperidyl, 1-, 2-, 3-Pyrrolidinyll, 2-, 3-Tetrahydrofuryll, 2-, 3-, 4-Morpholinyl. Dieser kann einfach oder mehrfach mit (C₁-C₈)-Alkoxy, (C₁-C₈)-Haloalkyl, OH, Halogen, NH₂, NO₂, SH, S-(C₁-C₈)-Alkyl, (C₁-C₈)-Alkyl substituiert sein.

Unter einem (C₆-C₁₈)-Arylrest wird ein aromatischer Rest mit 6 bis 18 C-Atomen verstanden. Insbesondere zählen hierzu Verbindungen wie Phenyl-, Naphthyl-, Anthryl-, Phenanthryl-, Biphenylreste. Dieser kann einfach oder mehrfach mit (C₁-C₈)-Alkoxy, (C₁-C₈)-Haloalkyl, OH, Halogen, NH₂, NO₂, SH, S-(C₁-C₈)-Alkyl, (C₁-C₈)-Alkyl substituiert sein.

Ein (C₇-C₁₉)-Aralkylrest ist ein über einen (C₁-C₈)-Alkylrest an das Molekül gebundener (C₆-C₁₈)-Arylrest.

(C₁-C₈)-Alkoxy ist ein über ein Sauerstoffatom an das betrachtete Molekül gebundener (C₁-C₈)-Alkyl-Rest.

(C₁-C₈)-Haloalkyl ist ein mit einem oder mehreren Halogenatomen substituierter (C₁-C₈)-Alkyl-Rest.

Ein (C₃-C₁₈)-Heteroarylrest bezeichnet im Rahmen der Erfindung ein fünf-, sechs- oder siebengliedriges aromatisches Ringsystem aus 3 bis 18 C-Atomen, welches Heteroatome wie z. B. Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel im Ring aufweist. Als solche Heteroaromaten werden insbesondere Rest angesehen, wie 1-, 2-, 3-Furyl, wie 1-, 2-, 3-Pyrrolyl, 1-, 2-, 3-Thienyl, 2-, 3-, 4-Pyridyl, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-Indolyl, 3-, 4-, 5-Pyrazolyl, 2-, 4-, 5-Imidazolyl, Acridinyl, Chinolinyl, Phenanthridinyl, 2-, 4-, 5-, 6-Pyrimidinyl. Dieser kann einfach oder mehrfach

mit (C₁-C₈)-Alkoxy, (C₁-C₈)-Haloalkyl, OH, Halogen, NH₂, NO₂, SH, S-(C₁-C₈)-Alkyl, (C₁-C₈)-Alkyl substituiert sein.

Unter einem (C₄-C₁₉)-Heteroaralkyl wird ein dem
(C₇-C₁₉)-Aralkylrest entsprechendes heteroaromatisches
5 System verstanden.

Als Halogene kommen Fluor, Chlor, Brom und Iod in Frage.

Enantiomerenangereichert oder enantiomer angereichert bezeichnet die Tatsache, dass eine optische Antipode im Gemisch mit ihrer anderen zu >50% vorhanden ist.

Die dargestellten Strukturen beziehen sich bei Vorliegen eines Stereozentrums auf beide möglichen Enantiomere und bei Vorliegen von mehr als einem Stereozentrum im Molekül auf alle möglichen Diastereomere und bezüglich eines Diastereomers auf die darunter fallenden möglichen zwei
15 Enantiomere der in Frage stehenden Verbindung.

Die genannten Literaturstellen gelten als von der Offenbarung dieser Erfindung mitumfasst.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von
enantiomerenangereicherten α -Hydroxycarbonsäuren oder
enantiomerenangereicherten α -Hydroxycarbonsäureamiden
5 ausgehend von einem Cyaniddonor, einem Aldehyd oder
Keton in Gegenwart einer Oxynitrilase und einer
Nitrilase oder einer Nitrilhydratase.
2. Verfahren zur Herstellung von
enantiomerenangereicherten α -Hydroxycarbonsäuren
10 ausgehend von einem Cyaniddonor, einem Aldehyd oder
Keton in Gegenwart einer Oxynitrilase und einer
Nitrilase.
3. Verfahren zur Herstellung von
enantiomerenangereicherten α -Hydroxycarbonsäureamide
15 ausgehend von einem Cyaniddonor, einem Aldehyd oder
Keton in Gegenwart einer Oxynitrilase und einer
Nitrilhydratase.
4. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis
3,
20 dadurch gekennzeichnet, dass
man die Oxynitrilase eines Organismus bzw. der
Pflanzebestandteile ausgewählt aus der Gruppe
bestehend aus *Sorghum bicolor*, *Hevea brasiliensis*,
Mannihot esculenta und Mandelkerne einsetzt.
- 25 5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1
und/oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass
man die Nitrilase eines Organismus ausgewählt aus der
Gruppe bestehend aus *Rhodococcus*-Stämmen bzw. aus
30 *Alcaligenes faecalis* einsetzt.
6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1
und/oder 3,
dadurch gekennzeichnet, dass

man die Nitrilhydratase eines Organismus ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *Rhodococcus spec.*, *Rhodococcus rhodochrous* und *Rhodococcus erythropolis* einsetzt.

- 5 7. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
man die Reaktion in einem wässrigen Medium bei einem
pH-Wert von 6,0-9,0 durchführt.
- 10 8. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
man die Reaktion in einem Temperaturintervall von 20-
40°C durchführt.
- 15 9. Enzymatisches Reaktionssystem aufweisend eine
Oxynitrilase, eine Nitrilase oder eine
Nitrilhydratase, Wasser, einen Cyaniddonor und einen
Aldehyd oder ein Keton.
- 20 10. Ganzzellkatalysator aufweisend ein kloniertes Gen für
eine Oxynitrilase und eine Nitrilase oder eine
Nitrilhydratase.
- 25 11. Ganzzellkatalysator nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet, dass
dieser im Falle des Vorliegens einer Nitrilhydratase
ebenfalls ein kloniertes Gen für eine Amidase
aufweist.

Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein enzymatisches Verfahren zur Herstellung von enantiomerenangereicherten α -Hydroxycarbonsäuren bzw. -amiden, welches in einem

5 Schritt die Umsetzung einer Carbonylverbindung zu der entsprechenden Säure/Amiden über die Zwischenstufe eines Cyanhydrins umfasst.

10 Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein dergestalt arbeitendes Reaktionssystem und ein für den Einsatz für diese Reaktion vorteilhaften Ganzzellkatalysator.